

磁珠法大体积游离 DNA 提取试剂盒

项目号: M670148

储存条件: 室温。**产品内容:**

Component	M670148 2 mL×48 preps
Buffer MPL	120 mL
20% SDS	6 mL
Buffer GW1 (concentrate)	80 mL
Buffer GCW2 (concentrate)	40 mL
RNase-Free Water	30 mL
Proteinase K	2×1.25 mL
Magbeads ZN	2×1 mL

产品简介

该试剂盒适用于从血浆、血清、羊水等无细胞体液中纯化回收游离DNA (Free-circulating/Cell-free DNA)。高盐时,游离DNA结合于硅基包被的磁珠表面。漂洗后,游离DNA洗脱于RNase-Free Water中。游离DNA的得率与样品类型、储存条件、时间以及个体间差异有很大关系。纯化得到的游离DNA质量稳定、可靠,可用于定量PCR、产前诊断等下游实验。

自备仪器、试剂

1. 全自动核酸提取仪
2. 无水乙醇、异丙醇
3. 24 DW Plate and Tips Pack

实验前准备及重要注意事项

1. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在 Buffer GW1 中加入无水乙醇。
2. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在 Buffer GCW2 中加入无水乙醇。
3. 若手动操作,在实验开始前将恒温混匀仪预热至 60℃。
4. Magbeads ZN 严禁冰冻和高速离心,否则可能会对 Magbeads ZN 造成不可逆的损害。Magbeads ZN 每次使用时请充分振荡混合均匀。
5. 用前请先检查 Buffer MPL 和 20% SDS 是否出现结晶或沉淀,如有结晶或沉淀现象,可在 37℃ 水浴几分钟,即可恢复澄清。

操作步骤(手动,以 2mL 血浆为例)

1. 按下表向离心管中依次加入 30 μ L Proteinase K、2 mL 血浆、100 μ L 20% SDS,放于 60℃、1200 rpm 恒温混匀仪上震荡 20 分钟,孵育结束后将离心管冰浴 5-10 分钟。

注:如无恒温混合仪,将离心管涡旋震荡 10 秒钟后放于 60℃ 水浴锅中孵育 20 分钟,期间每隔 7 分钟涡旋震荡 10 秒钟。

为避免蛋白酶 K 失活,请按下表试剂顺序依次加入,请勿将 SDS 直接加到蛋白酶 K 溶液中。

Reagent	血浆体积			
	1 mL	2 mL	4 mL	10mL
Proteinase K	15 μ L	30 μ L	60 μ L	150 μ L
血浆样本	1 mL	2 mL	4 mL	10mL
20% SDS	50 μ L	100 μ L	200 μ L	500 μ L
总体积	1.065mL	2.13 mL	4.26mL	10.65mL

2. 孵育过程中，按下表准备裂解液/磁珠混合液，并混合均匀。

Reagent	血浆体积			
	1 mL	2 mL	4 mL	10 mL
Buffer MPL	1 mL	2 mL	4 mL	10 mL
异丙醇	0.25 mL	0.5 mL	1 mL	2.5 mL
Magbeads ZN	15 μ L	30 μ L	60 μ L	150 μ L
总体积	1.265 mL	2.53 mL	5.06 mL	12.65 mL

3. 将步骤 2 中准备的裂解液/磁珠混合液加到步骤 1 样本管中。涡旋震荡 1 分钟，然后手工上下颠倒或使用混匀仪混匀 5-10 分钟，使磁珠一直处于悬浮状态。
4. 将离心管放于磁力架上静置，待磁珠吸附到磁力架上，管内溶液变澄清后，翻转离心管冲洗瓶盖上残留磁珠，再放置 1 分钟左右，之后弃去溶液。
5. 向离心管中加入 1 mL Buffer GW1（使用前请检查是否已加入无水乙醇），震荡混匀后将混悬液转移到新的 1.5 mL 离心管中。
6. 将离心管固定于磁力架上静置 1 分钟，之后弃去溶液。
7. 向离心管中加入 1 mL Buffer GW1（使用前请检查是否已加入无水乙醇），涡旋震荡 5 秒钟后放于 25℃、1600 rpm 的恒温混匀仪上震荡结合 2 分钟。
8. 将离心管固定于磁力架上静置 1 分钟，之后弃去溶液。
9. 向离心管中加入 1 mL Buffer GCW2（使用前请检查是否已加入无水乙醇），涡旋震荡 5 秒钟后放于 25℃、1600 rpm 的恒温混匀仪上震荡结合 2 分钟。
10. 将离心管固定于磁力架上静置 1 分钟，之后弃去溶液。
11. 重复步骤 9-10。
12. 离心管短暂离心后，将其重新固定于磁力架上用移液器去除管底溶液，开盖室温放置 5-10 分钟使乙醇充分挥发。
13. 向离心管中加入 50-100 μ L RNase-Free Water 后涡旋震荡使磁珠充分悬浮于洗脱液中，之后将离心管固定于 25℃、1600 rpm 的恒温混匀仪上震荡洗脱 10 分钟。
14. 将离心管固定于磁力架上静置 2 分钟，待 Magbeads 完全吸附于离心管侧壁后用移液器将洗脱液转移至新的离心管中-20℃保存备用。

操作步骤（以 4mL 血浆为例）

1. 按下表向 24 DW 深孔板中加入试剂：

血浆体积	2 mL	4 mL
位置	试剂及用量	试剂及用量
Plate 1	Proteinase K: 30 μ L 血浆: 2 mL 20% SDS: 100 μ L	Proteinase K: 60 μ L 血浆: 4 mL 20% SDS: 200 μ L
Plate 2	Buffer GW1: 1 mL	Buffer GW1: 1 mL
Plate 3	Buffer GW1: 1 mL	Buffer GW1: 1 mL
Plate 4	Buffer GCW2: 1 mL	Buffer GCW2: 1 mL
Plate 5	Buffer GCW2: 1 mL	Buffer GCW2: 1 mL
Plate 6	RNase-Free Water: 100 μ L	RNase-Free Water: 100 μ L

2. 将“24 DW Plate and Tips Pack”放入核酸提取仪的相应位置中，运行“CW2560 ctDNA 程序”。

3. 约 25 分钟后仪器暂停，将“Plate 1”拿出仪器后立即放到冰上 5-10 分钟，然后按下表加入试剂。

血浆体积	2 mL	4 mL
位置	试剂及用量	试剂及用量
Plate 1	Buffer MPL: 2 mL 异丙醇: 0.5 mL Magbeads ZN: 30 μ L	Buffer MPL: 4 mL 异丙醇: 1 mL Magbeads ZN: 60 μ L

4. 将 24 DW 深孔板放回仪器中，继续运行程序。约 45 分钟后程序运行结束。把“Plate 6”中的 DNA 洗脱产物转移至离心管中-20℃保存备用。